

[課程-2]

審査の結果の要旨

永野 佳子

本研究は、癌を初めとする様々な疾患の進行に関わる TGF- β シグナルの伝達の調節機構の詳細な解明の重要性から、特に TGF- β シグナル増強因子であるユビキチンリガーゼ Arkadia がどのようにしてシグナルを調節しているかを明らかにするため、生化学的・分子生物学的手法を用いて作用機構を検討したものであり、以下の結果を得ている。

- 1、 TGF- β 応答性のレポーターを用いたレポーターアッセイにおいて、Arkadia は、その分解基質である Smad7 をノックダウンした状態でもレポーター活性を上昇させた。このことから、Arkadia には Smad7 以外の分解基質がある可能性が考えられた。
- 2、 Arkadia は、Smad7 とは異なる作用点で TGF- β シグナルを抑制する SnoN および c-Ski と結合し、これらをユビキチン化し、プロテアソーム依存的な分解に導いて、代謝回転を速めた。
- 3、 Arkadia をノックアウトした ES 細胞では、SnoN の発現量がタンパク質レベルで高くなっていた。また、Arkadia をノックダウンした細胞では c-Ski タンパク質の蓄積が認められた。これらのことから、Arkadia が SnoN や c-Ski をタンパク質レベルで制御していることが明らかとなった。
- 4、 Arkadia および SnoN/c-Ski をいくつかの断片に分けて結合実験を行った結果、Arkadia の C 末端領域が基質との結合に重要であることが、また、Arkadia は SnoN/c-Ski 上の中央領域すなわち Smad4 の SnoN/c-Ski 上の結合部位を含む領域に結合することが示された。
- 5、 SnoN や c-Ski が Smad2/4 複合体と Arkadia に同時に結合し得るか調べるため、3 x CAGA 配列をプローブとした DNA-affinity precipitation (DNAP)法を用いて Smad4 を沈降させ、共沈する Smad2、SnoN または c-Ski、および Arkadia の検出を試みた。その結果、Arkadia は用量依存的に、Smad2、Smad4、SnoN/c-Ski を含む複合体に共沈した。また、この共沈は SnoN/c-Ski 依存的であった。これらのことから、Arkadia は、遊離している SnoN/c-Ski と、複合体中の SnoN/c-Ski とともに結合することが示唆された。
- 6、 TGF- β 応答性のレポーターを用いたレポーターアッセイにおいて、Arkadia は、その分解基質である Smad7、c-Ski、SnoN 全てを同時にノックダウンするとレポーター活性を上昇させなくなった。このことから、これら3つが Arkadia の主要な基質であると考えられた。
- 7、 20 種の癌細胞株における Arkadia、c-Ski、SnoN の発現量を mRNA およびタンパク質のレベルで調べた。Arkadia は mRNA レベルでもタンパク質レベルでも様々な癌細胞株で広範に発現していたのに対し、c-Ski と SnoN は mRNA もタンパク質も細胞株間でその発現量に大きな違いが認められた。また、OCUM-2MLN や MKN45 を含むいくつかの細胞株では、c-Ski や SnoN の発現

レベルが mRNA-タンパク質間で相関しなかった。

- 8、用いた癌細胞株において Arkadia が機能しているかどうか、Arkadia のノックダウンとそれに伴う c-Ski タンパク質の蓄積を指標に調べたところ、HeLa、MDA-MB-231、PC-3u、U373MG、MKN28/74 の各細胞では Arkadia のノックダウンによる c-Ski タンパク質の蓄積が認められたのに対し、OCUM-2MLN、MKN45 では Arkadia をノックダウンしても c-Ski タンパク質の蓄積は観察されなかった。これらのことから、OCUM-2MLN や MKN45 においては Arkadia が c-Ski に対して機能していない可能性が考えられた。

以上、本論文は、Arkadia が Smad7 および SnoN/c-Ski という作用点の異なる2種の TGF- β シグナル抑制因子をどちらも分解に導くことでより効果的にシグナルを増強することを明らかにし、また、癌における Arkadia の役割の解明の重要性を示した。本研究は、TGF- β シグナルの許容レベルを決定する因子の発見として重要であり、また、癌を含め、TGF- β シグナルや c-Ski/SnoN によって引き起こされる病理的・生理的現象のメカニズムの解明に更なる糸口を与えるものと考えられ、学位の授与に値するものと思われる。